

# 人造板材释放的甲醛所致遗传毒性的研究

刘 杰, 姚汉超, 陈茂林, 刘宏亮, 王光学, 严 彦, 杨 旭\* (华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

**摘要:**进行了两方面的 DNA 损伤实验: (1) 采用 SCGE 技术进行体外实验, 观察甲醛对大鼠肝细胞和人类淋巴细胞 DNA 损伤作用; (2) 采用微核技术进行体内实验, 观察甲醛对活体小鼠的骨髓嗜多染红细胞的微核率诱导作用. 结果表明在浓度为  $1.24 \text{ mg/m}^3$ 、 $3.71 \text{ mg/m}^3$  时, 不论是体内还是体外实验, 甲醛对细胞 DNA 都有明显的损伤作用. SCGE 实验结果还表明, 高浓度的甲醛可能引起 DNA 交联.

**关键词:**室内空气污染; 甲醛; 遗传毒性; SCGE; 微核; 大鼠肝细胞

## A study on the genetic toxicity of formaldehyde emitted from wood based panels

LIU Jie, YAO Hanchao, CHEN Maolin, LIU Hongliang, WANG Guangxue, YAN Yan, YANG Xu (College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

**Abstract:** In order to understand the genetic toxicity of formaldehyde emitted from wood based panels the studies were carried out on cell DNA damages: (1) Single cell gel electrophoresis (SCGE) test in vitro on rat liver cells and human lymphocytes. (2) Micronucleus test in vivo on mice marrow cells. The results showed that, whether in vitro or in vivo test, there were significant DNA damage in these cells at the concentrations of  $1.24 \text{ mg/m}^3$  and  $3.71 \text{ mg/m}^3$ . The higher of formaldehyde concentration may lead to the crosslinks of DNA.

**Keywords:** indoor air pollution; formaldehyde; genetic toxicity; SCGE; micronucleus; rat liver cells

室内装修带来的室内空气污染及其对人体健康的危害, 已经成为引人关注的环保问题. 在诸多的室内污染物中, 甲醛以其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点, 已成为我国最重要的室内空气污染物之一. 本文通过对体外 SCGE 实验和体内微核实验的数据分析, 探讨了人造板材释放的不同浓度气态甲醛的遗传毒性.

### 1 实验部分

#### 1.1 材料与试剂

人体外周血淋巴细胞由本实验室制备, 方法后述. Wistar 级大白鼠 (雄性, 体重 400—500 g) 和 SPF 级昆明纯系小鼠 (雄性, 体重 20—25 g) 购自湖北省防疫站动物实验中心. 小牛血清 (上海普飞生物制品公司)、正常熔点琼脂糖 (NMA) (Amresco 公司)、低熔点琼脂糖 (LMA) (Promego 公司)、 $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (BIB 公司)、十二烷基肌氨酸钠 (Amresco 公司)、溴化乙锭 (E. B) (Sigma 公司)、二甲基亚砜 (DMSO) (Amresco 公司)、Tris (Amresco 公司)、肝素钠 (徐州万邦生物公司)、Triton X-100 (Amresco 公司)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{HCl}$ 、 $\text{NaOH}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2$  (无水)、葡萄糖、 $\text{H}_2\text{O}_2$  均为分析纯. 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂).

收稿日期: 2002-08-13; 修订日期: 2002-09-16

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题 (2001BA704B01)

作者简介: 刘 杰 (1973—), 理学硕士. \* 通讯联系人 (Email: dryangxu@public.wh.hb.cn)

## 1.2 仪器设备

DYY 7B 型电泳仪(北京六一仪器厂);荧光显微镜(OLMPUS);4160 型甲醛分析仪(Interscan corporation);小型环境气候舱 WH2 型(武汉宇信公司);Nikon E-600 微分干涉显微镜;Nikon Type 9500 数码成像系统;磨砂载玻片(自制),其他常规实验设备.

## 1.3 实验过程

1.3.1 实验材料的获取 人体淋巴细胞获取:取 2 名健康男性静脉血各 2 mL,肝素抗凝.将血沿管壁缓缓加入内有 2 mL 淋巴细胞分离液的离心管中.水平离心机上离心,2000 r/min,30 min,收集淋巴细胞加 hank 液混匀,制成  $10^5$ /mL 细胞悬液.所得细胞用 0.4% 台盼蓝染色以检测存活率.

大鼠肝细胞获取:大鼠经断颈处死后,胸腹部皮肤消毒后,开腹腔取出肝脏,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去血迹,用无菌眼科剪剪成糜状,反复漂洗,然后用 4 层纱布滤去碎组织,600 r/min 离心 5 min,用 PBS 如此离心洗涤 3 次.将细胞悬浮于 5 mL PBS 中至所需浓度.所得细胞用 0.4% 台盼蓝染色以检测存活率.

1.3.2 仿真染毒方案 用于染毒的甲醛气体在 WH2 小型智能型环境气候舱中,用装载真实人造板材的方法进行配制,指示污染物定为甲醛.输出气体中甲醛浓度依靠装载人造板材的数量进行调节,并可以持续稳定地输出某一浓度的染毒气体;实验动物或细胞采用气体灌流染毒<sup>[1]</sup>,以模仿真实的暴露方式.染毒气体中甲醛浓度由 4160 型甲醛分析仪测定.

体内实验动物染毒:将 15 只小鼠,随机分为 3 组(对照组和甲醛处理组),每组 5 只小鼠.实验采用吸入式染毒,处理组在 8.4 L 玻璃染毒缸中动态染毒 72 h,染毒缸进气口甲醛浓度为  $1.24 \text{ mg/m}^3$  ( $23^\circ\text{C}$ ) 和  $3.71 \text{ mg/m}^3$  ( $23^\circ\text{C}$ ).染毒期间,动物可以自由进食和饮水;对照组也在同样的染毒缸中吸入经过滤的新鲜空气.

体外实验细胞染毒:将盛有细胞的培养皿直接放置于环境气候舱中,将舱气温调节至  $37^\circ\text{C}$ ,舱湿度调节至 45%,实现气体灌流,染毒时间为 1 h.甲醛浓度分别  $1.24 \text{ mg/m}^3$  和  $3.71 \text{ mg/m}^3$ .另取未经染毒的细胞进行阴性对照实验.

1.3.3 单细胞凝胶电泳和微核试验方法 单细胞凝胶电泳实验参照秦榛华和 Singh 方法进行<sup>[2,3]</sup>.实验步骤包括:制片、裂解、解旋、电泳、中和、染色等.

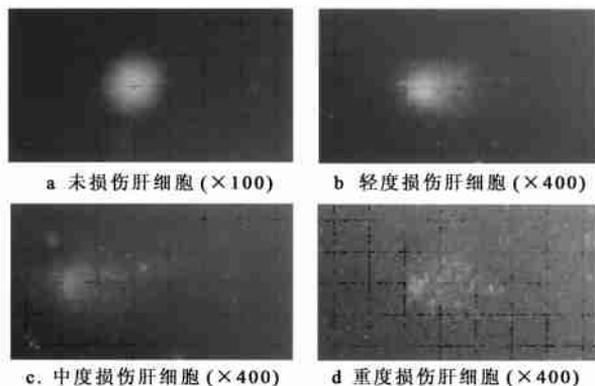


图 1 未受损伤细胞单细胞凝胶电泳图

Fig. 1 Photomicrograph of single cell electrophoresis in an undamaged and damaged cells

微核实验参照 Schmidt W 和朱炳富的方法进行<sup>[4,5]</sup>.实验步骤包括:制备骨髓液、涂片、固定、染色和观察及计数.

1.3.4 统计分析 应用 Excel 软件制图, SigmaPlot 3.2 软件进行 t 检验.

## 2 结果与分析

### 2.1 SCGE 对细胞 DNA 的损伤检测

见图 1. 从图 1(a—d)可以看出随着细胞 DNA 损伤程度的加大,细胞核逐渐变小,“彗星尾”(DNA 碎片)逐渐变长(增多),凝胶的荧光逐渐加强.实际操作中可以用彗星尾长评价细胞的损伤

程度.

## 2.2 2 种细胞 SCGE 实验结果

从表 1 和表 2 中可以看出在两种浓度下,大鼠肝细胞和人淋巴细胞均出现彗星现象,表明 2 种细胞均受到损伤. 与阴性对照组相比,其结果均有显著性差异. 但在  $3.71 \text{ mg/m}^3$  浓度组中,其细胞彗星率和尾长反而比  $1.24 \text{ mg/m}^3$  浓度组的细胞要少、要短.

表 1 大白鼠肝细胞的 SCGE 实验

Table 1 The length of migration and ratio of DNA damage in rat liver cells

甲醛剂 量分组	观察 细胞数	拖尾细胞		尾长( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm S$
		数目	百分率, %	
阴性对照	100	10	10	$5.6 \pm 1.7$
$1.24 \text{ mg/m}^3$	100	34	34 <sup>##</sup>	$17.3 \pm 6.3^{**}$
$3.71 \text{ mg/m}^3$	100	15	15 <sup>##</sup>	$10.2 \pm 3.6^{**}$

与阴性对照比较, <sup>##</sup>:  $\chi^2$  检验,  $P < 0.01$ ; <sup>\*\*</sup>:  $t$  检验,  $P < 0.01$ .

表 2 人血淋巴细胞的 SCGE 实验

Table 2 The length of migration and ratio of DNA damage in human lymphocytes

甲醛剂 量分组	观察 细胞数	拖尾细胞		尾长( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm S$
		数目	百分率, %	
阴性对照	100	9	9	$11.0 \pm 2.6$
$1.24 \text{ mg/m}^3$	100	37	37 <sup>##</sup>	$21.5 \pm 6.3^{**}$
$3.71 \text{ mg/m}^3$	100	18	18 <sup>##</sup>	$13.8 \pm 3.2^*$

与阴性对照比较, <sup>##</sup>:  $\chi^2$  检验,  $P < 0.01$ ; <sup>\*</sup>:  $t$  检验,  $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup>:  $t$  检验,  $P < 0.01$ .

## 2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形态

见图 2. 先以低倍镜、高倍镜粗检,选择细胞分散均匀,细胞无损,染色好的区域,再在油镜下计数,但需用有核细胞形态完好作为判断制片优劣的标准. 本法系观察嗜多染红细胞中的微核,嗜多染红细胞呈灰蓝色,而成熟的红细胞呈粉红色,微核大多数呈圆形,单个,边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,每只动物计数 5000 个嗜多染红细胞,观察含有微核的嗜多染红细胞数,畸变率以千分率表示,一个嗜多染红细胞中出现两个或更多微核,仍按一个微核细胞计数.

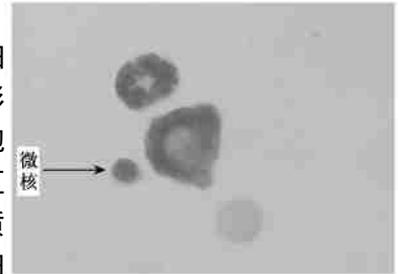


图 2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核

Fig. 2 Rat cells micronucleus of mice marrow

## 2.4 对照组及不同染毒组的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率

实验结果见表 3. 从表 3 右可以看出在  $1.24 \text{ mg/m}^3$  和  $3.71 \text{ mg/m}^3$  浓度下,其微核率与阴性对照组相比均有显著性差异. 而在  $3.71 \text{ mg/m}^3$  浓度下其结果比  $1.24 \text{ mg/m}^3$  也有显著性升高. 可见在  $1.24 \text{ mg/m}^3$  和  $3.71 \text{ mg/m}^3$  浓度下,甲醛对小鼠有明显的损伤作用.

## 3 讨论

### 3.1 SCGE 检测的遗传毒性

本研究应用 SCGE 观察了木质板材释放的气态甲醛在不同浓度水平时,对大鼠肝细胞和人体血淋巴细胞的遗传毒性. 实验中发现,当灌流气体中甲醛浓度在  $1.24 \text{ mg/m}^3$  和  $3.71 \text{ mg/m}^3$  时,均出现彗星细胞数目增加的情况,且出现率和尾长均与对照组有显著性差别,说明人造板材释放的甲醛气体在这两种浓度水平均具有遗传毒性.

但  $3.71 \text{ mg/m}^3$  组的彗星细胞数显著少于  $1.24 \text{ mg/m}^3$  组 ( $\chi^2$  检验,  $P < 0.01$ ),且彗尾长度也短于  $1.24 \text{ mg/m}^3$  组 ( $t$  检验,  $P < 0.01$ ),似乎不服从“剂量-效应”关系. 为了分析这种现象的原因,进行了甲醛可溶性实验:当灌流气体中甲醛浓度在  $1.24 \text{ mg/m}^3$  和  $3.71 \text{ mg/m}^3$  时,染毒 1 h (与细胞染毒的时间相同),相应细胞悬液中甲醛浓度的测定值为  $0.013 \text{ mmol/L}$ ,  $0.045 \text{ mmol/L}$

(该实验采用酚比色法进行<sup>[7]</sup>). 实验之后将结果与杨丹凤等人的研究进行比较<sup>[6]</sup>, 其结果对照见图 3. 虽然两组实验的材料不尽一样(本实验用的是大鼠肝细胞, 文献[6]用的是小鼠脾淋巴细胞), 但其结果和变化趋势基本相同: 在高浓度时彗星细胞发生率反而比低浓度时要低.

表 3 对照组与不同染毒组的骨髓嗜多染红细胞微核率(%)  
Table 3 The length of migration and ratio of DNA damage in rat liver cells

分组	样品量	各个小鼠的细胞微核率, ‰					平均值	标准差
阴性对照组	5	1.82	2.05	1.75	2.24	2.08	1.965	0.224
1.24 mg/m <sup>3</sup>	5	3.00	3.04	2.84	2.82	3.18	2.925 **	0.111
3.71 mg/m <sup>3</sup>	5	6.32	6.01	6.25	7.03	6.18	6.380 **	0.447

与阴性对照比较, \*\* : *t* 检验,  $P < 0.01$ .

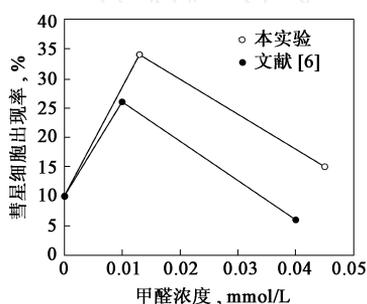


图 3 不同浓度甲醛所致  
“彗星”细胞百分率

Fig. 3 Comet cell rate caused by different formaldehyde concentrations

可以推断: 气态甲醛在低浓度时 1.24 mg/m<sup>3</sup> (溶于液体的甲醛浓度为 0.013 mmol/L) 对 DNA 的损伤以断裂为主, 在高浓度 3.71 mg/m<sup>3</sup> (溶于液体的甲醛浓度为 0.045 mmol/L) 对 DNA 的损伤以交联为主. 故 SCGE 在评价高剂量甲醛的遗传毒性时, 有一定的局限性. 但由于环境空气中甲醛的浓度水平一般低于 1 mg/m<sup>3</sup>, 所以用 SCGE 来评价气态甲醛的遗传毒性还是可行的.

### 3.2 微核实验检测的遗传毒性

从表 3 中可以看出, 染毒组和阴性对照组的微核出现率存在显著差异; 且随着剂量加大, 出现微核的细胞数量显著增加, 由此可知, 随着气态甲醛浓度增加, 对实验细胞的遗传毒性也在增强, 二者之间存在明显的剂量-效应关系.

同时, 注意到 SCGE 和微核实验的结果有差异. 分析原因, 认为是由于两种试验方法原理的不同造成的. 因为在 SCGE 试验中, 其断裂的小片断向阳极泳动, 但若片断较大(包括交联), 则其不会从细胞核中泳出. ;但在微核试验中, 断裂片断不会进入下一个细胞周期, 因而断裂片断的大小不会影响微核的形成. 因此建议: 在测定可疑的化学交联剂的遗传毒性时, 最好同时使用 SCGE 和微核实验, 并且作出综合评判.

致谢: 衷心感谢中国军事医学科学院卫生学环境医学研究所裘著革研究员的热情支持和悉心指导, 并感谢他无私地赠送给本实验室 SCGE 分析软件.

### 参考文献:

- [1] 李睿, 杨旭, 陈茂林, 等. 用于体内和体外实验的动态气体灌流染毒装置[J]. 中国卫生工程学, 2003, 2(1): 33—34
- [2] 秦精华, 沈建英, 黄仕和, 等. DNA 断裂检测方法(单细胞凝胶电泳)[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(6): 517—520
- [3] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1998, 175: 184—191
- [4] Schmidt W. The micronucleus test[J]. Mutat Res, 1975, 9—15
- [5] 朱炳富, 等. 微核测定法速评价理化因子诱变活力研究的进展[J]. 生物科学动态, 1979, (6): 26—36
- [6] 杨丹凤, 裘著革, 张华山, 等. 典型醛类污染物单独及联合作用对小白鼠淋巴细胞 DNA 损伤的离体实验研究[J]. 卫生研究, 2000, 29(1): 30—32
- [7] 崔九思, 王钦源, 王汉平. 大气污染监测方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997.